

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Reostunud elupaikadega seotud biokeemilised kaitsemehhanismid elusorganismidel:
kohastumused, plastilised vastused ja nendega seotud lõivsuhted**

Bakalaureusetöö
12 EAP

Maiken Abel

Juhendajad PhD Tuul Sepp
MSc Ciara Baines

TARTU 2020

INFOLEHT

Reostunud elupaikadega seotud biokeemilised kaitsemehhanismid elusorganismidel: kohastumused, plastilised vastused ja nendega seotud lõivsuhted

Käesoleva töö eesmärk on anda ülevaade reostunud elupaikades elavate elusorganismide võimekusest kohaneda ja kohastuda reostunud elukeskkonnaga. Töö eksperimentaalsas hinnatakse reostunud Purtse jões ja puhtamas Kunda jões elava hariliku trullingu (*Barbatula barbatula*) seisundit ning võimalikke kaitsekohastumusi ja kaitsekohastumuste hinda. Kaitsemehhanismide uurimiseks kasutati maksa glutatiooni kontsentratsiooni. Tulemustest ilmnes, et reostunud jõe kalade maksades ei esinenud kõrgemat glutatiooni kontsentratsiooni, kuid reostunud jõe kaladel oli suurem maks. Kehapikkuses, massis ja konditsioonis olulist erinevust kalade vahel ei leitud. Sugude võrdluses selgus, et isastel isenditel on kõrgem glutatiooni tase maksas kui emastel isenditel.

Märksõnad: veereostus, kohastumine, trulling, glutatioon

CERCS klassifikaatorid: B260 (hüdrobioloogia), B280 (loomaökoloogia), B360 (loomafüsioloogia)

Biochemical defense mechanisms in organisms related to polluted habitats: adaptations, phenotypic plasticity and trade-offs

The aim of this thesis is to give an overview of the ability of organisms to acclimatize and adapt to polluted environments. The experimental part of the thesis evaluates the conditions of stone loaches (*Barbatula barbatula*) living in the polluted Purtse river and in the cleaner Kunda river, as well as evaluating possible defense adaptations and trade-offs. The results showed that the fish living in the polluted river did not have higher concentration of glutathione in the liver, however, the fish from the polluted river had larger livers. No significant differences in body length, weight and condition were found. A comparison between the sexes showed that male individuals had higher levels of glutathione in the liver than females.

Keywords: aquatic pollution, adaptation, stone loach, glutathione

CERCS classifications: B260 (hydrobiology), B280 (animal ecology), B360 (animal physiology)

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Peamised reostuse liigid ja allikad erinevates keskkondades	6
1.2 Kohastumused ja kohanemine	10
1.3 Reostusega seotud kohastumuste uurimine	11
1.4 Seni kirjeldatud reostusega seotud kohanemised ja kohastumused	13
1.5 Kohastumuste ja kohanemisega seotud hind ja lõivsuhted	15
2 EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1 Töö eesmärgid	16
2.2 Materjal ja metoodika	17
2.2.1 Uurimuses kasutatud lahused	17
2.2.2 Uuringus kasutatud kalaliik ja välitööd	17
2.2.3 Uurimuse läbiviimine laboris	18
2.3 Tulemused	19
2.4 Arutelu	22
KOKKUVÕTE	25
RESÜMEE	26
TÄNUSÕNAD	27
KASUTATUD KIRJANDUS	28
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	35
LIHTLITSENTS	36

KASUTATUD LÜHENDID

AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) - arüülsüsivesinike retseptor

COX (*cytochrome c oxidase*)- tsütokroom-c oksüdaasi kompleks

GSH (*glutathione*) – glutatioon

HAH (*halogenated aromatic hydrocarbons*) - halogeenitud aromaatsed süsivesinikud

PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbons*) – polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud

PBDE (*polybrominated diphenyl ethers*) - polübroomitud difenüüleetrid

ROS (*reactive oxygen species*) - hapnikku sisaldavad aktiivsed osakesed

SISSEJUHATUS

Põlevkivi on eestlastele tähtsal kohal olnud juba möödunud sajandist ning on ka seda tänapäeval, olles Eesti peamine energiaallikas ning tähtsaim maavara. Kuigi tänapäeval on kaasatud põlevkivitööstusesse kaasaegsed tehnoloogiad ning reeglid, mille järgimine on keskkonda säästnud reostusest, ei ole põlevkivitööstuse mineviku pahed kuhugile kadunud.

Alates 1930. aastatest suunati põlevkivitööstuse toksilisi ühendeid sisaldanud reovett Purtse jõkke ning selle lisajõgedesse, mille tagajärjel said kannatada vees elavad organismid ning nende elukeskkond. Jõkke lõpetati reovee suunamine täielikult alles 1990. aastatel, kuid aastakümnete pikkune tugev jõe reostamine on jätnud oma jälje – jõest on kadunud liigirikkus ning reostust võib jõe ääres jalutades silmata läbi kaldal olevate pigilahmakate ning pinnase, mis lõhnab tugevalt õlijääkide järgi. Analüüsid jõest võetud proovidest näitavad, et jões esineb organismidele toksilisi ained nagu polütsükliised aromaatsed süsivesinikud ja raskmetallid ning kohati ületavad elutsooni piirarvu.

2018. alustati Purtse jõe taastamistööd ning jões on leidnud endale elupaiga kalaliik harilik trulling (*Barbatula barbatula*), kes on reostusele tundlik. Mitmed uuringud ja katsed on kinnitanud, et teatud liigid on võimelised tolereerima reostust läbi evolutsiooniliste protsesside nagu seda on kohastumused ja kohanemine - luues läbi nende endale kaitsemehhanismid, et ellu jääda ekstreemses keskkonnas.

Töö eesmärk oli uurida hariliku trullingu võimet tolereerida reostust Purtse jões, kasutades uurimiseks antioksidant glutatiooni põhist kaitsemehhanismi. Samuti oli eesmärgiks koguda algandmeid longitudinaalseks uurimuseks, et pärast jõe taastamistööd mõista muutusi seal elavate kalade füsioloogias ja morfoloogias.

Töö koostati Tartu Ülikooli Zooloogia osakonna loomaökoloogia õppetoolis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Peamised reostuse liigid ja allikad erinevates keskkondades

Majanduskoostöö ja Arengu Organisatsioon (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) defineerib reostust, kui ainete ja soojuse esinemist keskkonnas (vesi, maismaa, õhk), mille olemus, asukoht või kogus põhjustab soovimatut keskkonnamõju (OECD, 2003). Need soovimatud keskkonnamõjud mõjutavad omakorda ka keskkonnas elavate elusorganismide tervislikku seisundit ja elukvaliteeti (Orru *et al.*, 2016), kuid omavad olulist rolli ka majandusele. Energia ja Puhta Õhu Uuringute Keskus (Centre for Research on Energy and Clean Air, CREA) 2020. aasta uuringust selgub, et ainuüksi fossiilkütustest tingitud õhureostus tõi 2018. aastal kaasa hinnanguliselt 2,9 triljon USA dollarit (3,3 % maailma sisemajanduse kogutoodangust) majanduslikku kahju (CREA, 2020), rääkimata negatiivsest mõjust loodusele ja inimeste tervisele.

Õhureostust iseloomustab liikuvus, kuna mõned õhusaasteained on atmosfääris püsivad ja läbivad tuule abiga pikki vahemaid (Houghton *et al.*, 2001). Samuti võib õhusaasteainetega toimuda atmosfääris keemilisi reaktsioone, mis võivad muuta saasteaineid enne nende ladestumist (Manisalidis *et al.*, 2020).

Õhureostuse allikaid on nii looduslikke kui ka antropogeenseid. Allikad jagatakse neljaks põhiallikaks: mobiilsed allikad (fossiilkütustel sõitvad sõidukid), statsionaarsed allikad (mitmesugused tehased), piirkondlikud allikad (põllumajanduspiirkonnad ja linnad) ning looduslikud allikad (vulkanid ja metsatulekahjud) (Manisalidis *et al.*, 2020).

Levinumad õhusaasteained on vääveldioksiid (SO₂), peenosakesed (PM), süsinikmonooksiid (CO), lämmastikoksiidid (NO_x) ja osoon (O₃) (Cairncross *et al.*, 2007). Õhusaasteained mõjutavad loomade arengut ja tekitavad muutusi käitumises, eriti just teeäärsetes ökosüsteemides (Leonard & Hochuli, 2017). Samuti muudavad õhusaasteained taimede elukeskkonna happeliseks ning avaldavad mõju taimede füsioloogiale ja kasvule (Wright *et al.*, 2018). Taimedest sõltuvad aga paljud loomad ja linnud, kes kasutavad taimi elupaikadena ja toiduallikana (Wright *et al.*, 2018).

Euroopa Keskkonna Agentuuri (European Environment Agency, EEA) 2016. aasta raporti kohaselt satub vääveldioksiid (SO₂) keskkonda enamasti fossiilkütuste põletamise tagajärjel, veeauruga segunedes põhjustab SO₂ happevihmasid.

Raportis on väljatoodud, et peenosakesed (PM – *particulate matter*) jaotatakse sõltuvalt osakeste suuruselt kolme kategooriasse:

- $< 0,2 \mu\text{m}$ osakesi leiab suurel hulgal linnaõhus ning sellise suurusega osakesed on enamasti alles hiljuti eraldunud lähteallikast.
- $>0,2 - 2 \mu\text{m}$ osakesed on võimelised moodustuma väiksematest osakestest koagulatsiooni või aurude kondenseerumise teel, samuti võivad osakesed püsida atmosfääris stabiilsena 7 kuni 30 päeva ning nende sissehingamine on tõenäoline.
- $>2\mu\text{m}$ osakesed moodustuvad põhiliselt ilmastiku protsesside tagajärjel ning nende suuruse tõttu on osakeste püsivus atmosfääris väike, seetõttu on osakeste sissehingamise tõenäosus samuti väike.

Raport kirjeldab ka seost lämmastikoksiidide ja osooni tekke vahel. Lämmastikdioksiid (NO_2) tekib põlemisprotsessides, kuid lämmastikoksiidid on võimelised läbi fotokeemiliste reaktsioonide muutuma osooniks (O_3), mille tagajärjel moodustub sudu (EEA, 2016).

EEA 2019. aasta raporti kohaselt on **veekeskkonnale** murekohaks ained, mis on toksilised, stabiilsed ja võimelised toiduahelas akumuleeruma. Sellisteks aineteks on raskmetallid, polütsüklilised aromaatsed ühendid (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH), organotiinid ja muud kahjulikud sünteetilised ained ja polübroomitud difenüüleetrid (*polybrominated diphenyl ethers*, PBDE).

Raport kirjeldab, et veereostuse allikad on nii mere-, maismaa-, kui ka atmosfääripõhised. Merepõhistest allikatest võib näiteks tuua elusressursside kasvatamine nagu vesiviljelus, taastumatute energiaallikate kasutamine ning erinevad heited laevadelt. Maismaapõhisteks allikateks võib lugeda puhastusjaamade heitvett ning reovett linnadest ja põllumajandus piirkondadest. Atmosfääripõhised allikad on aga naftaplatvormid ja laevade kütusepõletamisel tekkivad ühendid (EEA, 2019). Näiteks 2010. aastal toimunud plahvatus naftaplatvormil Deepwater Horizon põhjustas laiaulatusliku reostuse, mille tagajärjel toimusid muutused kalade morfoloogias, käitumises ning metabolismis. Siiski tuleb märkida, et reostuse tolereerimine erines liigiti ning osad liigid tulid reostusega paremini toime kui teised (Pasparakis *et al.*, 2019).

Raskmetallid on metallid ja metalloide rühm, mille tihedus on üle $4 \pm 1 \text{ g/cm}^3$ (Duffus, 2002). Raskmetallide eripära ning murekoht keskkonnale peitub selles, et raskmetallid on keskkonnas püsivad, nimelt nad ei lagune ega hävi (Mohammed *et al.*, 2011). Väikeses koguses on raskmetallid

organismidele vajalikud näiteks ensüümide kofaktorite näol - pikemaajaline kokkupuude on ohtlik ning tekitab vähki ja muid kahjustusi loomade organitele (Tchounwou *et al.*, 2012). Nimelt metalliioonid interakteeruvad rakukomponentidega, põhjustades DNA kahjustusi ja konformatsioonilisi muutuseid, mille tagajärjeks võib olla rakutsükli modulatsioon, kartsinogenees või apoptoos (Beyersmann & Hartwig, 2008).

Polütsüklilised aromaatsed ühendid (PAH – *polycyclic aromatic hydrocarbons*) on orgaanilised ühendid, mida võib leida nii vees, õhus kui ka pinnases, kusjuures veekeskkonda satuvad PAH-id enamasti läbi naftareostuse ning mõjutavad seal elavate organismide tervislikku seisundit (Honda & Suzuki, 2020). PAH-id põhjustavad vähki ning häirivad luude ja maksa metabolismi, samuti mõjutavad veeorganismide varajast arengut ja sigimist, ka on täheldatud nende ühendite bioakumulatsiooni organismides (Honda & Suzuki, 2020).

Polübroomitud difenüüleetrid (PBDE – *polybrominated diphenyl ethers*) on bioakumuleeruvate halogeenitud ühendite klass, millel on palju otstarbeid: tulekustutid, elektriseadmed, erinevad ehitusmaterjalid ning erinevad katted ja tekstiilid, nende peamiseks allikateks on olmeprügi nagu elektroonika ja mööbel (Siddiqi *et al.*, 2003). Samuti on PBDE-l hea säilivus reoveesetetes (La Guardia *et al.*, 2001). PBDE-d mõjutavad kalade kilpnääret ja järglaste saamist läbi endokriinsete häiringute (Yu *et al.*, 2015). PBDE-d mõjutavad kilpnäärme hormoone (Yu *et al.*, 2015), mis omakorda mõjutavad organismi kasvu ja arengut – eriti aju arengut (Gilbert *et al.*, 2012), seega on võimalus, et PBDE-l on mõju ka kalade järglaste arengule.

Pestitsiididel on keemilised omadused, mis suurendavad nende püsivust keskkonnas ning need jõuavad veeökosüsteemidesse põllumajandusmaade äravooluvee ja kuivendamise kaudu. Nad lahustuvad vees hästi ning omavad pikka poolestusaega (Morrissey *et al.*, 2015). Mõju elusorganismidele on uuritud eelkõige putukatel. Näiteks on paljudel putukatel pikk vastsestaadium vesikeskkonnas ning kokkupuude pestitsiididega võib pikendada vastsestaadiumi kestvust (Morrissey *et al.*, 2015). Samuti on uuringud Hollandis näidanud seost veeputukate populatsioonidele (Dijk *et al.*, 2013; Morrissey *et al.*, 2015) ja neonikotinoidide toksiliste jääkide olemasolu veekogudes ning nende mõjust putuktoiduliste põllulindude vähenemisele (Hallmann *et al.*, 2014; Morrissey *et al.*, 2015). Uuringuid on tehtud ka kaladega – hiljuti avaldatud artiklis uuriti

pestitsiidide mõju kalaliikidele, kelle elupaigaks on riisipõllud. Uuringust selgus, et kaladel esineb teatud komponentide suhtes bioakumulatsiooni ning antioksidandi põhised kaitsemehhanismid ei toiminud piisavalt hästi, et kalasid pestitsiidide eest kaitsta. Lisaks täheldati ka pestitsiidide neurotoksilist mõju kaladele (Rossi *et al.*, 2020).

Mikroplastiks loetakse sünteetilisi orgaanilisi polümeeri osakesi, mille maksimaalseks läbimõõduks loetakse 5 mm (Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012; Duis & Coors, 2016). Mikroplasti neelavad alla ja väljutavad paljud vees elavad organismid, kusjuures tuleb märkida, et bioakumulatsioonist ja biomagnifikatsioonist veel selgeid tõendeid ei ole (Duis & Coors, 2016). Samas on laborikatsetega näidatud, et mikroplasti allaneelamine põhjustab toidu omastamise efektiivsuse langust ja seepärast on mõju ka isendi energiatasemele ja teistele füsioloogilistele protsessidele (Duis & Coors, 2016). Mikroplast satub veekeskkonda enamjaolt suuremate plastitükkide hõõrdumise ja purunemise tagajärjel (Duis & Coors, 2016).

EEA andmetel on tootmissektoritel suur panus **pinnasereostusesse**, samuti on oluline panus ka kaevandustel. Tootmissektoris peetakse kõige saastavamaks metallitööstust, kusjuures teised tööstused (näiteks: tekstiilitööstused) ei panusta nii palju pinnasereostusesse. Samuti annavad oma panuse ka põllumajanduses kasutatavad tõrjevahendid ja väetised (EEA, 2014).

EEA andmetel on levinuimad pinnasereostuse tekitajad mineraalõlid ja raskmetallid ning allikateks on rohke jäätmete tekkega seotud protsessid nagu jäätmete kõrvaldamine ilma loata, ohtlike ainete vale käitlemine tööstus- ja kaubandusprotsessides ning ka erinevad õnnetused (EEA, 2014). Pinnases elavatest organismidest on näiteks vihamaussidel suur roll mulla ökosüsteemis, kuid erinevad toksilised ained nagu pestitsiidid ja raskmetallid võivad tekitada DNA kahjustusi ning mõjutada ensümaatilisi aktiivsusi, mille tagajärjel väheneb isendite kasvukiirus ning muutused käitumises (näiteks: toitumises) (Uwizeyimana *et al.*, 2017). Reostunud pinnas ei mõjuta aga ainult mullas elavaid organisme, oma roll on ka toiduahelal, mille kaudu jõuavad toksilised ained teiste organismideni, sealhulgas ka inimeseni (Uwizeyimana *et al.*, 2017).

1.2 Kohastumused ja kohanemine

Kohanemine on vastusena keskkonnamuutustele toimuvad muutused organismi füsioloogias, anatoomias, morfoloogias ja käitumises, mis toimuvad isendi elu jooksul ja mille tagajärjel paraneb isendi ellujäämine uues keskkonnas. Kohanemise ulatust piirab indiviidi genoom ning kohanemisega kaasnevad muutused tunnustes ei pärandu järglastele (Demmig-Adams *et al.*, 2008).

Kohastumused on organisme nende elukeskkonda paremini sobituma panevad tunnused, mis kujunevad loodusliku valiku teel (Bock, 1980). Erinevalt kohanemisest hõlmab kohastumine geneetiliste tunnuste omandamist või rekombinatsiooni mitme põlvkonna jooksul (Demmig-Adams *et al.*, 2008), seega kanduvad tunnused sigimise käigus vanematelt järglastele edasi.

Kohanemine ja kohastumused on potentsiaalsed päästerõngad reostunud keskkonnas elavatele elusorganismidele. Kohastumine võib olla ainus viis, kuidas ohustatud liigid saavad ennast kaitsta, kui liigil puudub ümberasustamise võimalus, kas siis looduslikult või läbi inimkäe (Hoffmann & Sgrò, 2011). Samas tuleb silmas pidada, et ühel populatsioonil põhinevad mudelid näitavad, et tingimuste kiirel muutumisel on väljasuremine tõenäolisem kui evolutsioon (kohanemine ja kohastumused) (Hoffmann & Sgrò, 2011). Ka mõjutab reostunud keskkonnast pääsemist liigi geneetiline varieeruvus ning sellest tingitud potentsiaal evolutsiooniks, nimelt vähese geneetilise varieeruvusega liigid on eriti vastuvõtlikud muutustele ja seetõttu on sellistel liikidel limiteeritud võime kohaneda reostunud keskkonnaga (Hoffmann & Sgrò, 2011). Kuna väike potentsiaal suurendab väljasuremise riski, saab madalat geneetilist varieeruvust kasutada tunnuseks, mis aitab tuvastada tingimuste muutumisel ohustatud populatsioonid ja liigid (Fox *et al.*, 2019). Selline informatsioon ilmselt võimaldaks tuvastada teadlastel enim abivajavaid liike ning käituda vastavalt, kui liigi elukeskkonnas hakkavad toimuma muutused, mida liik enam ei suuda taluda.

Evolutsiooniline päästmine toimib eelkõige liikidel, kellel on suhteliselt kiire uute põlvkondade pealetulek ja suured populatsioonid (Catullo *et al.*, 2019). Praegused inimtegevuse poolt põhjustatud keskkonnamuutused on väga kiired ning ka organismid peavad suutma kohaneda või kohastuda selle kiirusega, kuid kohastumist mõjutavad geneetiline varieeruvus ja valikusurve tugevus (Catullo *et al.*, 2019). Uute keskkonnatingimustega kohanemisel on kaks mehhanismi. Esimeseks mehhanismiks on fenotüübilise plastilisuse väljendumine ehk indiviidi genotüübi võime ekspresseerida erinevaid fenotüüpe vastuseks keskkonnamuutustele. Teiseks mehhanismiks on evolutsioon läbi valiku, kus eelistatakse kindlaid fenotüüpe ning mille tagajärjel geneetiline varieeruvus populatsioonis muutub (Fox *et al.*, 2019). Tuleb märkida, et plastilisus toimub ühe

indiviidi tasemel ning see on kiirelt reageeriv mehhanism. Plastilisus võib anda liikidele muutunud keskkonnas aega juurde, aga selle piisavus sõltub sellest, kui kiiresti tingimused muutuvad (Fox *et al.*, 2019).

Kui keskkonnas toimub kahjulik muutus, sõltub kohasus rohkem häiringu sagedusest kui tugevusest (Bell & Collins, 2008). Tihti ei suuda looduslikud populatsioonid kohastuda krooniliste antropogeensete stressoritega nagu seda on reostus. Looduslikud populatsioonid võivad olla võimelised taluma tugevat valikusurvet, kuid kohastumine on tõenäolisem, kui muutus on tagasihoidlik ja esineb suur geneetiline varieeruvus (Bell & Collins, 2008).

1.3 Reostusega seotud kohastumuste uurimine

Kohastumise kui evolutsioonilise protsessi uurimisel keskendutakse geenipõhiste mehhanismidele, mikroevolutsioonile ning plastilistele vastustele. Tuleb märkida, et eksperimendid, mis ühendavad mitmeid lähenemisviise (näiteks: demograafilised, molekulaargeneetilised ja kvantitatiivsed meetodid) annavad täpsemaid tõendeid adaptiivse reaktsiooni kohta (Loria *et al.*, 2019). Eksperimente saab teostada nii laboris kui ka välitöödel.

Evolutsiooni toimumise tõestamiseks on mitmeid viise: fenotüübiliste tunnuste muutuste uurimine, geenipõhiste tunnuste erinevuste analüüsimine, aga ka kohasuse muutuste uurimine vastusena geenipõhiste tunnuste muutustele (Donihue & Lambert, 2015). **Kohasus** (ing K. *fitness*) on siinses kontekstis organismide võime ellu jääda ja järglasi saada organismi ümbritsevas keskkonnas (Orr, 2009).

Fenotüübiliste tunnuste muutuste uurimisel mõõdetakse tunnuste muutuseid gradiendi lõikes, linnastumise uurimisel näiteks linnasiselt ja linnaväliselt. Gradiendipõhiselt kirjeldatavad üleminekud tunnustes pakuvad informatsiooni võimalike evolutsiooni suundade kohta, kuid tuleb märkida, et ainult fenotüübiliste tunnuste muutused ei tõesta evolutsiooni (Donihue & Lambert, 2015).

Alati ei ole vaja uurida geene, et leida toetust kohastumise toimumisele. Üheks võimaluseks geenipõhiste tunnuste eristamiseks fenotüübilisest plastilisusest ja seega kohastumise demonstreerimiseks on erinevatest keskkondadest kogutud isendite kasvatamine sarnastes keskkonnatingimustes (ing K. *common garden*). Katsesse valitakse individid erinevatest algpopulatsioonidest ning kasvatakse koos üles samas keskkonnas sünnist või koorumisest alates.

Kui huvipakkuv tunnus erineb samas keskkonnas kasvatatud indiviidide vahel, siis eeldatakse huvipakkuv tunnus geenipõhiseks. Samuti saab keerukama katsedisainiga anda ülevaate tunnuse plastilisusest. Lisaks tuleb märkida, et kuigi selliste katsetega saab tõestada tunnuse plastilisust ja geenipõhisust, ei võimalda sellised katsed välja selgitada, kas uuritav tunnus on ka oma originaalkeskkonnas kasulik kohastumus (Donihue & Lambert, 2015)

Et uurida, kas muutunud tunnuse puhul on tegemist ka elukeskkonda sobituva kohastumusega, kasutatakse vastastikkust ümberasustamist. Nii saab uurida, kas uuritava tunnuse poolest erinevad “kodupopulatsioon” ja “ümberkolitud populatsioon” on ka erineva kohasusega (Blanquart *et al.*, 2013; Donihue & Lambert, 2015). Kui ümberasustatud populatsioonis jääb uuritav tunnus muutumatuks ja sellega kaasneb kohasuse langus, võib eeldada, et tegemist oli kohastumusega, mis sobis isendi või populatsiooni originaalsesse elupaika.

Seda meetodit on edukalt rakendatud ka reostusega seotud kohastumuste uurimiseks. Näiteks katses *Caenorhabditis elegans*’iga kasutati reostuse tolereerimise uurimiseks samas keskkonnas kasvatamise (*common garden*) kui ka vastastikuse ümberasustamise meetodit (Dutilleul *et al.*, 2017). Nagu varem mainitud, saavutatakse täpsemad tõendid just kombineeritud meetodeid kasutades (Loria *et al.*, 2019). Katses uuriti, mis mõju avaldab liigile uraani olemasolu keskkonnas ning kas liik on võimeline elama keskkonnas, kus on kõrgem soolasisaldus. Samuti uuriti uraani ja soolsuse kombinatsiooni mõju liigile. Katse näitas, et liik on võimeline kiiresti toime tulema nii uraani kui ka kõrgema soolsusega, kuid kohastumusega kaasnes ka hind, nimelt vähenes kohastumisega koos viljakus (Dutilleul *et al.*, 2017).

Tuleb märkida, et mõnel juhul ei pruugi tavalised sama keskkonna ja vastastikuse ümberasustamise katsed veenvalt tõestada, kas täheldatud tunnuste erinevustel on geneetiline alus. Seega on soovitatav ka kasutada genoomset skaneerimist, mis tuvastab positiivse valiku all olevad geenid, ja seostada kohasuse jaoks oluliste tunnuste varieerumist genoomi hõlmavate DNA polümorfismidega (Donihue & Lambert, 2015).

Kohastumise uurimiseks saab teha ka laborikatseid, milles kombineeritakse fenotüübi-, geeni-, selektsiooni- ja populatsioonipõhiseid teste (Loria *et al.*, 2019). Näiteks saab tuua 2016. aasta uuringu kalaliigi *Fundulus heteroclitus* (hammaskarbiline) põhjal. *Fundulus heteroclitus* on paigaline liik, mis on eluvõimeline aladel, kus reostus on viimastel aastakümnetel jõudnud surmava tasemeni. Uuringus koguti 43 – 50 isendit kaheksast populatsioonist, neli reostusele tolerantset populatsiooni tugevalt reostatud aladelt ning neli reostusele tundlikku populatsiooni lähedusest

referentsiks. Uuringus kasutati RNA sekveneerimist populatsioonide unikaalsete ja ühiste funktsionaalsete radade uurimiseks ning adaptiivsete, valikule viitavate märkide tuvastamiseks. Uuringust selgus, et valiku ühine sihtmärk oli arüülsüsivesinike retseptoril põhinev signalisatsioonirada (Reid *et al.*, 2016).

1.4 Seni kirjeldatud reostusega seotud kohanemised ja kohastumused

Loomade võimet reostunud keskkonnaga kohaneda ja kohastumusi luua on näidanud nii mitmed laborikatsed kui ka uuringud vabalt looduses elavate liikide põhjal. Kuigi on suudetud näidata, et teatud liigid suudavad tõesti reostusega kohaneda ja kohastumusi luua, on enamasti mehhanismid, mis kohastumist põhjustavad, teadmata. Siiski leidub näiteid, kus reostunud keskkonnas elavatel liikidel on suudetud kindlaks määrata kaitsemehhanismi põhimõte, või vähemalt osa kaitsemehhanismist on suudetud kindlaks teha.

Fundulus grandis ja *Fundulus heteroclitus* on kalaliigid, kes elavad Mehhiko lahe põhjaosas, kus vesi on teatud piirkondades reostunud halogeenitud aromaatsete süsivesinikega (HAH-*halogenated aromatic hydrocarbons*) ja polütsükliiliste aromaatsete süsivesinikega. Need ühendid põhjustavad kalade embrüotel südame väärarenguid. Nagu ülal kirjeldatud, siis põhjus, miks need liigid suudavad letaalses keskkonnas elutseda peitub 77kb deletsioonis AHR1a ja AHR2a tandem paraloo geenides. Nimelt vahendab arüülsüsivesinike retseptoril (AHR) põhinev signalisatsioonirada halogeenitud aromaatsete süsivesinike poolt esile kutsutud teratogeneesi. Sellisel modifikatsioonil on võtmeroll kohastumuses, kuna deletsiooniga isendid ei ole tundlikud toksilistele ühenditele. Kohastumuse geneetilist alust tõestab resistentsuse esinemine vähemalt kahel põlvkonnal, kes on ümber asustatud puhtasse keskkonda (Oziolor *et al.*, 2019).

Kaladel on tõestatud ka kohastumist anorgaanilise reostusega. *Poecilia mexicana* on kalaliik, kes elutseb divesiniksulfiidi rikkas vees. Divesiniksulfiid (H_2S) blokeerib tsütokroom-c oksüdaasi kompleksi (COX) ning inhibeerib seeläbi aeroobse respiratsiooni. Katsed kolme populatsiooniga näitasid, et kahes populatsioonis on toimunud *cox1* ja *cox3* geenides aminohapete vahetumine (*cox1* geenis isoleutsiin-metioniin ja valiin – isoleutsiin asendused ja *cox3* geenis isoleutsiin-valiin asendus). Kolmandas populatsioonis aga ei tuvastatud vähenenud tundlikust divesiniksulfiidile,

mis viitas sellele, et vähenenud tundlikkus saavutatakse läbi mõne teise mehhanismi (Pfenninger *et al.*, 2014).

Katsed on näidanud, et varasemad kokkupuuted kliimamuutustega võivad aidata reostusega paremini toime tulla. Varasemalt hapnikuvaegusega toime tulnud isendite keskkonda järk-järgult siirdemetalli lisades oli isendite kudedes metalli kogunenud vähem kui isendites, kes varasemalt ei olnud kohanenud hapnikuvaegusega (Dolci *et al.*, 2014). Samuti on täheldatud, et temperatuuritõusu tolereerivatel isenditel võib olla suurenenud vastupidavus raskmetallist tingitud reostusele (Dorts *et al.*, 2014).

Reostuse tolereerimine paneb organismi füsioloogilised süsteemid suure stressi alla ning reostusest tingitud tagajärjed võivad organismi mõjutada ka pärast aega, mil keskkonna reostuskoormus on langenud. Katse mikroplastiga ja selle mõju karp *Mytilus galloprovincialis*'le näitas, et reostusega võitlemisel on suured metaboolsed ja energeetilised kulud stressivalkude tootmise, stiimulitele reageerimise ning ainevahetuse võimendamise tõttu. Katse kestvus oli kokku 18 päeva, mille jooksul kasutasid karbid kompenseerivaid mehhanisme, kuid kuu aega pärast tingimuste normaliseerumist olid stressiga seotud valgud siiski ülesreguleeritud. Katsest järeldati, et 30 päevasest taastumisperioodist ei piisa mikroplasti poolt põhjustatud stressi ja kahjustuste kompenseerimiseks (Détrée & Gallardo-Escárate, 2018).

Ookeanide hapestumisel on märgatud mõju karpide nagu *Ruditapes philippinarum* lubjastumisprotsessile. Nimelt tarbivad karbid enamjaolt lubjastumise jaoks tarviliku anorgaanilise süsiniku mereveest, mis on ka energeetiliselt kulukam. Et happelises keskkonnas paremini hakkama saada, lülituvad karbid ümber ja hakkavad kasutama suuremal määral metaboolset süsinikku. Arvatakse, et karbid käituvad nii, kuna teatud ensümaatilised aktiivsused, mis on vajalikud süsiniku transportimiseks, on happelises keskkonnas oluliselt pärssitud. Tuleb märkida, et isendid, kelle vanemad on kokku puutunud happelise keskkonnaga, võivad eelistatult kasutada metaboolset süsinikku lubjastumise protsessi jaoks. Arvatavasti kasutavad karbid metaboolset süsinikku kompensatsioonimehhanismina, et muuta süsiniku keemilisi omadusi toimuva protsessi läheduses (Zhao *et al.*, 2018).

1.5 Kohastumuste ja kohanemisega seotud hind ja lõivsuhted

Kuna kohanemise ja kohastumisega kaasnevad sageli muutused füsioloogilistes protsessides või isegi morfoloogias, võib organism tekitada kaitse küll reostatud keskkonna vastu, kuid sellega võib kaasneda ka hind või lõivsuhted. Selle hinna mõistmine on oluline, et tundma õppida isendite resistentsuse evolutsiooni antropogeensetele stressoritele (Duttilleul *et al.*, 2017). Liigid on võimelised kohastuma ja kohanema abiootiliste stressoritega, kuid populatsioonid võivad kaitse tagajärjel muutuda haavatavamaks sekundaarsetele stressoritele (Jayasundara *et al.*, 2017). Hind võib seisneda selles, et reostusega kohanenud populatsioonidel on madalam kohasus võrreldes kontrollgrupiga pärast populatsioonide tagasi viimist esialgsesse keskkonda, samas tuleb märkida, et hind sõltub ka reostuse tüübist (Duttilleul *et al.*, 2017). Seda väidet saab illustreerida *Caenorhabditis elegans* abil. Nimelt liik saavutas kiiresti taluvuse uraani ja NaCl suhtes, kuigi esimestes põlvkondades nähti kohasuse vähenemist, siis hiljem aga kiiret kohasuse suurenemist. Soolases keskkonnas vähenes viljakus, kuid elutsükliid muutusid pikemaks – seega ellujäämine oli tähtsam kui embrüote arv. Keskkonnas, kus esines uraani, oli isenditel aga kiire kasv, varane viljakus ja seetõttu ka kiirem põlvkondade vahetumine, ehk kiire elutsükkel aitas vähendada ajaliselt kokkupuudet reostusega (Duttilleul *et al.*, 2017).

Ekstreemses keskkonnas hakkama saamine on energeetiliselt kulukas, väiksemad kehamõõtmed ja madal metabolismi kiirus on võimalused kulude vähendamiseks (Passow *et al.*, 2017). Energeetilist kulu aga tekitavad ainete imendumine, antioksidandi põhised vastused ning samuti ka intensiivsem DNA ja kudede parandamine. Ka tavalised kaitsesüsteemid võivad võimenduda, näiteks kaladel limatootmine, kuid liigne limatootmine võib mõjutada toitainete omandamist ja kaitset patogeenide eest (Hamilton *et al.*, 2017). Nagu varem mainitud, on AHR retseptori geenides toimunud deletsioon tõhus päästerõngas kahe kalaliigi jaoks, kuid AHR retseptoritel on oluline roll immuunsüsteemi funktsioneerimisel, seega võib hind olla seotud immuunsusega. Samuti, kui kaitse põhineb muudatustes geenides, mis mõjutavad erinevate steroidhormoonide metabolismi, võib hind peituda paljunemises ja vere kolesterooli tasemes (Hamilton *et al.*, 2017).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Uurimuse eesmärgiks oli analüüsida reostunud Purtse jõe hariliku trullingu (*Barbatula barbatula*) võimet tolereerida reostust, kasutades kontrollgrupina puhtamas Kunda jões elavaid liigikaaslasi. Kohastumuse/kohanemise uurimiseks koguti proove nii DNA kahjustuste kui ka kaitsemehhanismide uurimiseks. Hüpoteesiks oli, et reostunud jõe isenditel on võrreldes kontrollgrupi isenditega kaitsemehhanismid ülesreguleeritud. Kaitsemehhanismidena uuriti maksa suurust, kuna maks on peamine reoainete detoksifikatsiooniga tegelev organ, ning antioksidandi glutatiooni taset maksas. Kahjustuste osas suunatud hüpoteesi ei olnud, kuna on võimalik, et ülesreguleeritud kaitsemehhanismid ennetavad reostusega seotud kahjustusi. Kahjustuste markeriks plaaniti kasutada DNA kahjustuste mõõtmist (ühe raku elektroforeesi meetod, Comet assay, (Collins, 2009)). Võimaliku kaitsemehhanismi hinnana mõõtsime kalade suurust, sest aeglasem kasv võib olla kaladel reostuse tolereerimise hinnaks (Passow *et al.*, 2017). Lisaks oli uurimuse eesmärk koguda algandmeid longitudinaalseks uurimuseks, et pärast Purtse jõe taastamistöid mõista muutusi seal elavate kalade füsioloogias ja morfoloogias. Seoses koroonapandeemiaga õnnestus plaanitud analüüsides läbi viia vaid osa, kaitsemehhanismide uuring. DNA kahjustuste analüüsid lükkusid edasi ja on plaanitud sooritada osana magistriprojektist.

Purtse jõgi saab alguse Lääne-Virumaalt ning suubub Soome lahte - enne põlevkivitööstust oli jõgi tähtis lõhejõgi, kuid tänaseks on jõgi põlevkivitööstuse reovee tõttu muutunud üheks reostunuimaks jõeks Eestis (Keskkonnaministeerium, 2019). Jõe reostamine sai alguse 1930. aastatel ning jõe seisukord oli pikalt saladuses kuni 1960. aastateni, mil algas pikaajaline seire ja tuvastati, et jõgi on tugevalt reostunud. Jõe reostamine toimus põhiliselt aastavahemikus 1930. – 1980., kuid lõplik reovee suunamine jõkke lõpetati alles 1990. aastatel. Tänapäeval on käimas juba jõe puhastusprotsessid, mis said alguse 2018. aastal ning peaksid lõppema 2022. aasta teises pooles (Keskkonnaministeerium, 2019). Veekvaliteeti on mõjutanud peamiselt väljapumbatud kaevandusvesi ja tööstuse reovesi, reostust aitavad kanda jõkke ka jõe kaks lisajõge – Kohtla ja Erra jõgi (AS Maves, 2008). Eesti Keskkonnauuringute Keskuse andmetel on jääkreostus põhiline faktor, mis takistab jõe seisundi taastumist (Eesti Keskkonnauuringute Keskus, 2015). AS Maves poolt läbi viidud uuring 2008. aastal tuvastas jões õlilaike, mis tulid pinnale jõe põhjas sondeerides, samuti nähti kallastel pigilahmakaid, kusjuures pigitükke leiti ka kivide alt ning tahkestunud naftasaaduseid võis näha ka kaldal. Jõe mudal oli tugev õlijääkide lõhn ning analüüsid näitasid, et

kohati on jões naftasaaduste ja PAH-ide sisaldus sihtarvu ja elutsooni piirarvu vahel, samuti leiab jõest raskmetalle ning fenooli, mis kohati ületasid elutsooni piirarve (AS Maves, 2008).

Kaitsemehhanismina uuriti glutatiooni taset maksas. Glutatioon (GSH) on rakusisene tiol, mis on osa kaitsemehhanismist oksüdatiivse stressi ja vabade radikaalide vastu (O'Neill et al., 2000). Oksüdatiivne stress kahjustab rakke läbi hapnikku sisaldavate aktiivsete osakeste (ROS – *reactive oxygen species*), mis pärinevad mitmesugustest keemilistest reostusainetest, sealhulgas raskmetallide ioonid ja PAH-id (Sukhovskaya et al., 2017).

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Uurimuses kasutatud lahused

Glutatiooni uurimuses kasutati KPE puhvrit (0.1, pH 7.5), TCA lahust, DNTB lahust, β -NADPH lahust glutatioon reduktaasi lahust ning glutatiooni standardeid. KPE puhver segati kokku kasutades 16 ml lahust A (6.8 g KH_2PO_4 , 500 ml dH_2O) ning 84 ml lahust B (8.5 g K_2HPO_4 , 500 ml dH_2O) ning korrigeeriti kuni lahuse pH oli 7.5, seejärel seejärel lisati 0.186 g EDTA naatriumsoola. TCA lahust lahjendati veega suhtes 1:10. DNTB lahust saadi 2 mg DNTB lahustamisel 3 ml KPE puhvris ning β -NADPH lahust saadi 2mg β -NADPH lahustamisel 3 ml KPE puhvris. Glutatioon reduktaasi lahust koosnes 40 μl glutatioon reduktaasist, mis lahustati 3 ml KPE puhvris. DNTB, β -NADPH ja glutatioon reduktaasi lahuseid hoiustati uurimuse vaheetappidel külmikus ja kaitsti valguse eest fooliumiga.

Purtse ja Kunda jõe isendite glutatiooni tasemete võrdlemiseks tehti glutatiooni standardid. Stokklahuse saamiseks lahustati 1 mg glutatiooni 1 ml KPE puhvris. Seejärel lahjendati stokklahust KPE puhvriga suhtele 1:100. Standardite lahjendusrida oli järgmine: 26.4 nM/ml, 13.2 nM/ml, 6.6 nM/ml, 3.3 nM/ml, 1.65 nM/ml ja 0.825 nM/ml.

2.2.2 Uuringus kasutatud kalaliik ja välitööd

Uuringus kasutati kalaliiki harilik trulling (*Barbatula barbatula*). Trulling on põhjalähedase eluviisiga ning samuti otsib toitu põhjast (Hunt, 2012), seetõttu on Purtse jõe setetesse kogunenud reostusega otseses kontaktis. Liik on Eestis väga levinud (Hunt, 2012), seega on hea liik jõgede võrdlemiseks. Trulling on reostusele tundlik ning trullingu puudumine liigile muidu sobivas keskkonnas võib viidata reostusele (Miller & Loates, 1997).

Kalad püüti 4. oktoobril 2019. aastal Kunda ja Purtse jõest, püügiks kasutati elektripüüki, mis oli kooskõlastatud Keskkonnaametiga. Kalade püüdmiseks lasti elektrivool jõkke, mis hetkeks uimastas kalad, ning kalad püüti kahvaga kinni. Seejärel pandi kalad tünnidesse ning toodi laborisse, kus neid hoiti aereeritud veetünnides kuni edasiste uuringuteni järgmisel päeval. Kokku kasutati uuringus 40 isendit, ülejäänud isendid viidi tagasi loodusesse.

2.2.3 Uurimuse läbiviimine laboris

Püütud kaladest proovide jaoks materjali eraldamiseks toodi kalad laborisse, kus neid hoiti aereeritud veetünnides. Enne proovide kogumist surmati kalad MS222 (*tricaine methanesulfonate*) lahusega. Seejärel määrati kalade sugu ning mõõdeti kalade pikkus ja kehakaal, samuti eraldati maks ning pärast maksa kaalumist lõigati maksast tükid glutatiooni taseme ja DNA kahjustuse mõõtmiseks. Proove säilitati kuni analüüsimiseni -80 °C sügavkülmikus.

Analüüse alustati vajalike lahuste tegemisega, mille kontsentratsioonid on väljatoodud eelnevas alapeatükis. Samuti võeti maksaproovid välja -80 °C sügavkülmast ning pandi külmikusse sulama. Kokku oli 40 proovi ning need jaotati pooleks, seega analüüse tehti kahes korduses, kasutades mõlema osa jaoks sama metoodikat.

Seejärel kaaluti ära katsetuub ning katsetuubides olevad maksaproovid, maksaproovidele lisati KPE puhvrit suhtes 1:10 vastavalt maksaproovi kaalule.

Pärast KPE puhvri lisamist homogeniseeriti maksaproovid kasutades segu ZrO ja klaashelmestest kuni proovide homogeniseerumiseni. Seejärel lisati proovidele 50 µl TCA lahust ning proove segati vortexil 3 korda 15 minutise ajavahemiku jooksul, kusjuures proove hoiti vahepealsel ajal külmikus.

Proovide segamisele järgnes proovide tsentrifuugimine 15 minutit 3000g ja 4°C juures (rootori tüüp – *fixed angle*), kuid vea tõttu pooled proovid tsentrifuugiti 14 °C juures. Tsentrifuugitud proovidelt eemaldati 20 µl supernatanti ning pipeteeriti mikrotiiterplaadile. Seejärel segati võrdses koguses (1:1) DNTB lahust ja GR lahust ning pipeteeriti 120 µl lahuste segu mikrotiiterplaadile, samuti lisati mikrotiiterplaadile 60 µl β-NADPH lahust.

Järgnes proovide analüüsimine neeldumise kaudu mikrotiiterplaadi lugejal (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, U.S.A.) 412 nm juures ning mõõtmine toimus iga 30 sekundi tagant kahe minutilise perioodi vältel. Muutust neeldumises kasutati glutatiooni kontsentratsiooni

määramiseks maksaproovides ning tulemusi võrreldi standardkõvera tulemustega, mis saadi eelnevas alapeatükis kirjeldatud glutatiooni standardite lahjenduste analüüsi teel.

2.3 Tulemused

Laboris toimunud analüüsidele järgnes statistiline analüüs. Tunnus glutatsioon ei olnud normaaljaotusega ning ka logaritmimistransformatsioon ei muutnud tunnust normaalseks, seetõttu kasutati kahe jõe võrdlemiseks U-testi ja korrelatsioonide uurimiseks Spearmani astakkorrelatsioone. Ülejäänud tunnused (mass, pikkus) olid normaaljaotusega ning nende analüüsiks kasutati T-testi. Konditsiooni arvutamiseks kasutati pikkuse ja kaalu regressioonianalüüsi jääkväärtusi (Kaufman *et al.*, 2007).

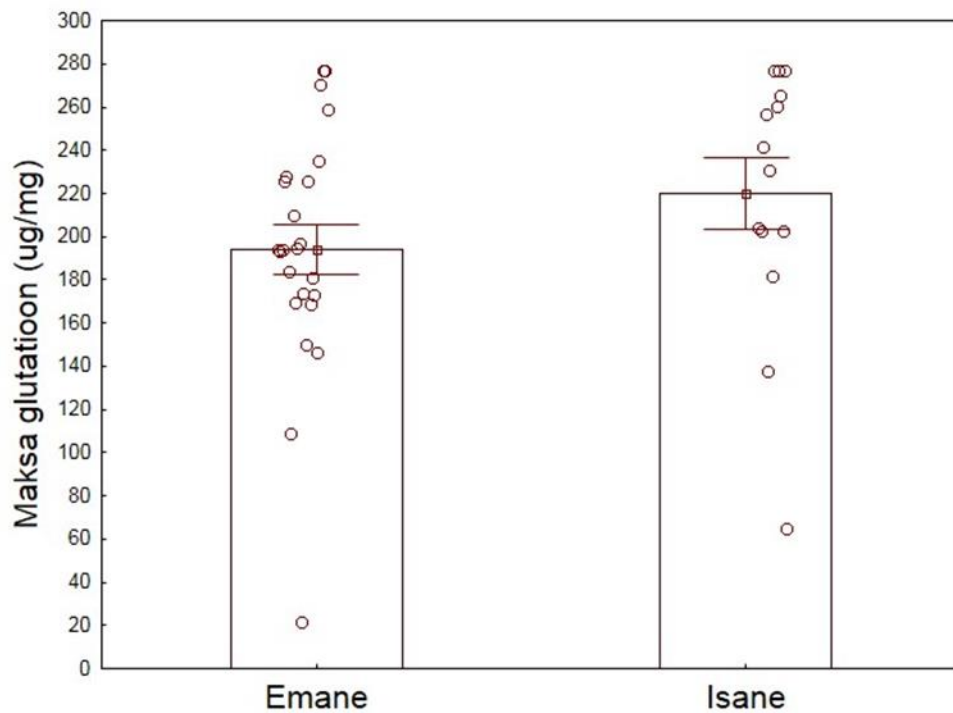
Glutatiooni kontsentratsioonis ei olnud erinevusi Purtse ja Kunda jõe trullingute vahel (Tabel 1, $U=193.0$, $Z=-0.18$, $p=0.860$). Purtse jõe kaladel oli suurem maks kui Kunda jõe kaladel ($U = 93$, $Z = -2.71$, $p = 0.007$). Kehapikkuses ($t = 1.28$, $p = 0.208$), massis ($t = 1.7$, $p = 0.100$) ja konditsioonis ($t = 1.4$, $p = 0.167$) elupaikade vahel erinevusi ei olnud, kuigi Kunda jõe kalad näitasid mitteolulist veidi kõrgema kehamassi ja konditsiooni trendi (Tabel 1). Maksa suuruse ja glutatiooni kontsentratsiooni vahel seost ei olnud (Spearman $R = -0.09$, $p = 0.567$). Sugude võrdlusest selgus, et isastel isenditel oli glutatiooni kontsentratsioon kõrgem kui emastel isenditel (Tabel 2, $U=86.0$, $Z=-2.21$, $p=0.027$). Isaste ja emaste pikkus ($t = -0.74$, $p = 0.463$), mass ($t = -0.13$, $p = 0.894$), konditsioon ($t = 1.67$, $p = 0.105$) ja maksa mass ($U = 118$, $Z = 1.33$, $p = 0.183$) ei erinenud.

Tabel 1. Purtse ja Kunda jõe trullingute võrdlus (keskmine \pm standardviga). Valim 20 kala mõlemast elupaigast.

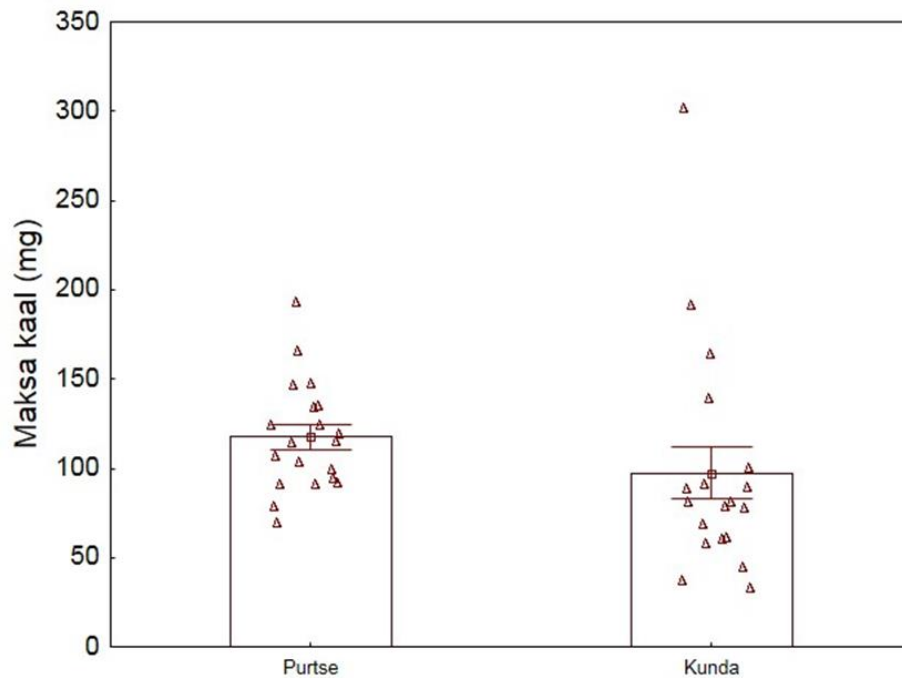
Elupaik	Mass (g)	Pikkus (cm)	Konditsioon	Maksa mass (mg)	Maksa glutatioon ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Purtse	$5,1 \pm 0,3$	$91,3 \pm 1,8$	$-0,17 \pm 0,12$	$117,5 \pm 6,8$	$203,1 \pm 11,6$
Kunda	$6,3 \pm 0,7$	$95,9 \pm 3,1$	$0,17 \pm 0,24$	$97,5 \pm 14,7$	$201,0 \pm 72,8$

Tabel 2. Isaste ja emaste trullingute võrdlus (keskmine \pm standardviga). Isaseid 14, emaseid 24, kahe kala sugu ei olnud võimalik määrata.

Sugu	Mass (g)	Pikkus (cm)	Konditsioon	Maksa mass (mg)	Maksa glutatioon ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Emane	$5,79 \pm 0,55$	$93,5 \pm 2,5$	$0,10 \pm 0,16$	$194,2 \pm 11,5$	$194,2 \pm 11,5$
Isane	$5,89 \pm 0,38$	$96,2 \pm 2,2$	$-0,31 \pm 0,17$	$232,0 \pm 12,1$	$220,1 \pm 16,4$



Joonis 1. GSH kontsentratsioon vastavalt soole. Tulpade kõrgus näitab keskmist, vurrud standardviga. Ringid näitavad individuaalseid andmepunkte.



Joonis 2. Isendite maksa kaal Purtsse ja Kunda jões. Tulpade kõrgus näitab keskmist, vurrud standardviga. Kolmnurgad näitavad individuaalseid andmepunkte.

2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli hinnata reostunud Purtse jõe ja puhtama Kunda jõe trullingute tervislikku seisundit ning võimalikke kaitsekohastumusi ja kaitsekohastumuste hinda suure reostuskoorma vastu. Kuna käimas on Purtse jõe taastamine, on kogutud andmete põhjal võimalik „loodusliku katse“ abil hinnata reostuskoormuse vähendamise seotud muutusi kalade tervises ja kaitsekohastumustes.

Tulemustest selgus, et Purtse jõe trullingutel olid maksad suuremad kui Kunda jõe trullingutel. AS Maves uuringust selgus, et Purtse jões on hulgaliselt PAH-e ja raskmetalle (AS Maves, 2008). Võib arvata, et reostunud jõe kalade suuremad maksad on seotud reostusega toimetulemisega läbi intensiivsema detoksifikatsiooni - PAH-e metaboliseeritakse peamiselt maksas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 2008) ning samuti toodetakse seal raskmetallide akumulereerimise jaoks abistavaid valke (Zeitoun, 2014). Kuigi PAH-e metaboliseeritakse mitmetes erinevates kudedes, on maksal suurim PAH-ide biotransformatsiooni aktiivsus kaaluühiku kohta, nimelt - maksa-sapi süsteemis metaboliseeritakse PAH-id polaarsemateks ühenditeks ning väljutatakse kehast seedetrakti kaudu (Snyder *et al.*, 2020). PAH-e metaboliseeritakse peamiselt maksas selletõttu, et seal on suur hulk ensüüme (nt tsütokroom P450 ensüüme), mille ülesanne on muuta PAH-e polaarsemateks ühenditeks (ATSDR, 2008). Tuleb märkida, et 1999. aasta uuringus Narva jõest püütud ahvenatega (*Perca fluviatilis*) näitasid tulemused, et põlevkiviõlitööstusest pärit PAH-id akumulereerusid rohkem maksas kui teistes kudedes (Tuvikene *et al.*, 1999). Raskmetallidega kokupuutel hakatakse maksarakkudes sünteesima metallotioone, mis on mittekatalüütilised valgud ning omavad rolli raskmetallide akumulatsioonis (Vergani *et al.*, 2005). Lisaks võib arvata, et Purtse jõe kalade maks on suurem akumulereunud toksiliste ainete tõttu. Uuringuid suurema maksa ja sellest tingitud hinna kohta ei leidnud, kuid võib oletada, et hind seisneb aine- ja energiakulus, mida põhjustab intensiivne detoksifikatsioon ja selleks vajalike ensüümide ning valkude tootmine. Lisaks võivad PAH-ide detoksifitseerimisel tekkivad vaheühendid olla organismile omakorda mürgised (Baali & Yahyaoui, 2019)

Tulemused näitasid ka seda, et Purtse ja Kunda jõe trullingutel ei esinenud erinevusi glutatiooni kontsentratsioonis. On võimalik, et Purtse jõe trullingud ei ole võimelised tõstma oma biokeemilisi kaitsereaktsioone reostusega toimetulekuks. Glutatiooni kontsentratsioonides erinevuste puudumine võib viidata ka sellele, et trullingud ei kasuta sellist tüüpi reostusega toimetulekuks glutatiooni kontsentratsiooni tõusu. Katse *Oreochromis niloticus*'ga näitas, et PAH-ide kõrge

kontsentratsioon ei mõjutanud märgatavalt glutatiooni S-transferaasi aktiivsust, samas madalate kontsentratsioonide juures nähti märgatavalt suuremat aktiivsust (Pathiratne & Hemachandra, 2010). Sama liigiga (*Oreochromis niloticus*) on tehtud katse raskmetalli mõjudest kala glutatiooni tasemele ning tulemused näitasid, et glutatiooni tase vähenes ning glutatiooni S-transferaasi aktiivsus aga suurenes, uuringus märgiti ära, et glutatiooni taseme langus võib olla seotud suurenenud glutatiooni S-transferaasi aktiivsusega, mis kasutab glutatiooni, et moodustada ksenobiootikumidest hüdrofiilsemaid ühendeid (Eroglu *et al.*, 2015). Arvatavasti tuleks mõõta Purtse ja Kunda jõe trullingutel lisaks glutatiooni S-transferaasi aktiivsust, et tõestada glutatiooni kasutamist kaitsemehhanismina.

Purtse ja Kunda jõe trullingutel ei esinenud erinevusi kehapikkuses, kehamassis ega konditsioonis mis võib viidata sellele, et Purtse jõe trullingud ei maksa hinda kaitsekohastumuste eest morfoloogilistes tunnustes. Samas tuleb märkida, et Kunda jõe kalad näitasid mitteolulist veidi kõrgemat kehamassi ning konditsiooni trendi, mis võib viidata sellele, et suurema valimi korral oleks võinud see tulemus olla ka oluline. Kasvukiiruse hüpoteesi võimaldaks testida kalade vanuse uuring, mida saab teostada kalade sisekõrvas asuvate kuulmekivikeste abil. Selline analüüs on tulevikus võimalik, kuna uuringusse kaasatud kalad säilitati sügavkülmikus Samuti võib kaitsekohastumuste hind peituda mujal – antud uuringu põhjal ei saa välistada, et hind makstakse madalamas sigimisedukuses või lühemas elueas.

Tulemustest selgus, et isastel isenditel oli glutatiooni tase kõrgem kui emastel. Trullingud koevad marja kividele ning marja valvavad isased trullingud (Miller & Loates, 1996). AS Maves uuringust selguse, et jõe põhi on kohati tugevalt reostunud (AS Maves, 2008). On võimalik, et kõrgem glutatiooni tase isastel võib olla tingitud sugudevahelisest käitumiserinevusest, mis eksponeerib isaseid reostusele, mida põhjustab marja valvamine jõe põhjas ning sellest põhjustatud pikemaajaline paigal olek ühes kohas. Samas tuleb märkida, et tulemustes on kaasa arvatud ka vähesel reostuskoormusega Kunda jõe trullingud ning kindlalt sellist hüpoteesi praeguste andmete põhjal kinnitada ei saa.

Tulemusi oleks saanud täiendada DNA kahjustuste mõõtmise kaudu, mis antud olukorras lükkus edasi tulevikku. DNA kahjustuste mõõtmine oleks andnud informatsiooni oksüdatiivse stressi esinemise kohta (Collins, 2009) – kas Purtse jões elavatel trullingutel esineb võrreldes Kunda jõe trullingutega oluliselt suuremal määral DNA kahjustusi? Kui ei, siis arvatavasti Purtse jõe kaladel

kaitsemehhanismid töötavad ning nad on kohastunud või kohanenud elama reostunud elukeskkonnas.

Käesolev uuring ei võimalda eristada kohastumusi ja kohanemist. Kuna kogutud proove on veel varus, on tulevikus võimalik uurida populatsioonidevahelisi erinevusi genoomis, mis võiks aidata välja selgitada, kas toimunud on looduslik valik reoainete detoksifikatsiooniga seotud geenides. Lisaks võimaldab kohastumusi ja kohanemist eristada järgnevatesse aastatesse plaanitud korduvuuring. Kui Purtse jõe seisundi paranedes erinevused kahe jõe kalade tervises seisundi ja kaitsemehhanismide vahel kaovad, võib eeldada, et tegemist oli pigem kohanemise kui kohastumusega. Sellise uuringu tarbeks oleks aga taaskord abi, kui tulevikus oleks olemasolevatest proovidest võimalik analüüsida genoomipõhiseid kaitsekohastumusi, näiteks reoainete metabolismiga seotud geenide ekspressioonitaset.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli uurida Purtse jõe hariliku trullingu (*Barbatula barbatula*) võimet tolereerida reostust, kasutades kontrollgrupina puhtamas Kunda jões elavaid liigikaaslasi. Kaitsemehhanismina uuriti glutatiooni kontsentratsiooni maksas.

Uuringu tulemused näitasid, et reostunud Purtse jõe ja puhtama Kunda jõe trullingutel ei olnud erinevusi glutatiooni kontsentratsioonis, kuid reostunud jõe kaladel oli võrreldes puhtama jõe kaladega suurem maks. Kehapikkuses, massis ja konditsioonis olulist erinevust trullingutel ei esinenud. Samuti ei olnud seost maksa suuruse ja kontsentratsiooni vahel.

Sugude võrdlusest selgus, et isastel isenditel oli võrreldes emaste isenditega glutatiooni kontsentratsioon kõrgem. Samas pikkuses, massis, konditsioonis ja maksa massis sugude vahel erinevusi ei esinenud.

Käesolev uuring ei võimalda eristada Purtse jõe trullingute kohanemist ja kohastumist, kuid seda on võimalik uurida tulevikus läbi populatsioonidevaheliste erinevuste genoomis ning korduvuuringute. Samuti oleks tulemusi saanud täiendada läbi DNA kahjustuste mõõtmise, kuid antud olukorras lükkus samuti tulevikku.

RESÜMEE

Biochemical defense mechanisms in organisms related to polluted habitats: adaptations, phenotypic plasticity and trade-offs

Summary

Maiken Abel

The aim of this thesis was to analyze the Purtse river stone loach's ability to tolerate pollution, the specimens from cleaner Kunda river were used as control group. The liver's glutathione concentration was used to study the defense mechanism.

The results showed that the fish living in the polluted river did not have higher concentration of glutathione in the liver, however, the fish from the polluted river had larger livers. Larger liver could be the result of heavy metal accumulation and the fact that metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbons into more polar compounds takes place in the liver. The cost of a larger liver could be related to increased energy use and changes in metabolism.

Fish from the polluted Purtse river and cleaner Kunda river did not differ in body length, mass or condition. This could indicate that in Purtse river stone loaches the cost of the defense mechanism is not in morphological traits, but costs in reproduction and lifespan cannot be ruled out.

The results showed that male individuals had higher glutathione concentrations than female specimens, which could be due to sex-specific differences in behavior leading to different exposure to pollution. However, the results include individuals from the cleaner Kunda river and for that reason this hypothesis cannot be confirmed on the basis of current data.

To confirm whether Purtse river stone loaches have adapted or acclimatised to the polluted habitat, more analyzes such as evaluating DNA damage and comparison of the two population's genomes have to be conducted in the future.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma suurepärast juhendajat Tuul Seppa, kes oli alati abivalmis ja andis head nõu. Samuti soovin tänada Ciara Baines'i, kes juhendas mind välitöödel ning laboris. Veel tänaksin Lauri Saksa, kes tutvustas mulle välitööde võlusi, ning koos Randel Kreitsbergiga jagas huvitavaid teadmisi harilikust trullingust.

Lõpuks sooviksin tänada oma lähedasi suure toetuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Baali, A., & Yahyaoui, A. (2019). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Influence to Some Aquatic Species. *Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86213>
- Bell, G., & Collins, S. (2008). Adaptation, extinction and global change. *Evolutionary Applications*, 1(1), 3–16. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00011.x>
- Beyersmann, D., & Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82(8), 493. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0313-y>
- Blanquart, F., Kaltz, O., Nuismer, S. L., & Gandon, S. (2013). A practical guide to measuring local adaptation. *Ecology Letters*, 16(9), 1195–1205. <https://doi.org/10.1111/ele.12150>
- Bock, W. J. (1980). The Definition and Recognition of Biological Adaptation. *American Zoologist*, 20(1), 217–227. JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/3882363>
- Cairncross, E. K., John, J., & Zunckel, M. (2007). A novel air pollution index based on the relative risk of daily mortality associated with short-term exposure to common air pollutants. *Atmospheric Environment*, 41(38), 8442–8454. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.07.003>
- Catullo, R. A., Llewelyn, J., Phillips, B. L., & Moritz, C. C. (2019). The Potential for Rapid Evolution under Anthropogenic Climate Change. *Current Biology*, 29(19), R996–R1007. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.028>
- Collins, A. R. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.002>
- Demmig-Adams, B., Dumlao, M. R., Herzenach, M. K., & Adams, W. W. (2008). Acclimation, p. 15–23. In S. E. Jørgensen & B. D. Fath (ed.), *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00001-X>
- Détrée, C., & Gallardo-Escárate, C. (2018). Single and repetitive microplastics exposures induce immune system modulation and homeostasis alteration in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 83, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.018>

- Dijk, T. C. V., Staalduinen, M. A. V., & Sluijs, J. P. V. der. (2013). Macro-Invertebrate Decline in Surface Water Polluted with Imidacloprid. *PLOS ONE*, 8(5), e62374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062374>
- Dolci, G. S., Vey, L. T., Schuster, A. J., Roversi, Kr., Roversi, K., Dias, V. T., Pase, C. S., Barcelos, R. C. S., Antoniazzi, C. T. D., Golombieski, J. I., Glanzner, W. G., Anezi Junior, P. A., Gonçalves, P. B. D., Nunes, M. A. G., Dressler, V. L., Baldissierotto, B., & Burger, M. E. (2014). Hypoxia acclimation protects against oxidative damage and changes in prolactin and somatolactin expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to manganese. *Aquatic Toxicology*, 157, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.015>
- Donihue, C. M., & Lambert, M. R. (2015). Adaptive evolution in urban ecosystems. *Ambio*, 44(3), 194–203. JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/24670711>
- Dorts, J., Kestemont, P., Thézenas, M.-L., Raes, M., & Silvestre, F. (2014). Effects of cadmium exposure on the gill proteome of *Cottus gobio*: Modulatory effects of prior thermal acclimation. *Aquatic Toxicology*, 154, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.030>
- Duffus, J. H. (2002). “Heavy Metals”- a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793–807.
- Duis, K., & Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: Sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0069-y>
- Dutilleul, M., Réale, D., Goussen, B., Lecomte, C., Galas, S., & Bonzom, J.-M. (2017). Adaptation costs to constant and alternating polluted environments. *Evolutionary Applications*, 10(8), 839–851. <https://doi.org/10.1111/eva.12510>
- Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E. G., Atli, G., & Canli, M. (2015). Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(5), 3229–3237. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2972-y>
- Fox, R. J., Donelson, J. M., Schunter, C., Ravasi, T., & Gaitán-Espitia, J. D. (2019). Beyond buying time: The role of plasticity in phenotypic adaptation to rapid environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1768). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0174>

- Gilbert, M. E., Rovet, J., Chen, Z., & Koibuchi, N. (2012). Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *NeuroToxicology*, 33(4), 842–852. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.11.005>
- Hallmann, C. A., Foppen, R. P. B., van Turnhout, C. A. M., de Kroon, H., & Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511(7509), 341–343. <https://doi.org/10.1038/nature13531>
- Hamilton, P. B., Rolshausen, G., Uren Webster, T. M., & Tyler, C. R. (2017). Adaptive capabilities and fitness consequences associated with pollution exposure in fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1712), 20160042. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0042>
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>
- Hoffmann, A. A., & Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470(7335), 479–485. <https://doi.org/10.1038/nature09670>
- Honda, M., & Suzuki, N. (2020). Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1363. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041363>
- Houghton, J. E. T., Ding, Y., Griggs, D., Noguer, M., van der Linden, P., Dai, X., Maskell, M., & Johnson, C. (2001). Climate Change 2001: The Scientific Basis. *Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*, p.881.
- Hunt, T. (2012). Trulling (*Barbatula barbatula*), p.106. In Mikli, M. (ed.), Eesti kalad., Varrak, Tallinn.
- Jayasundara, N., Fernando, P. W., Osterberg, J. S., Cammen, K. M., Schultz, T. F., & Di Giulio, R. T. (2017). Cost of Tolerance: Physiological Consequences of Evolved Resistance to Inhabit a Polluted Environment in Teleost Fish *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Science & Technology*, 51(15), 8763–8772. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01913>
- Kaufman, S. D., Johnston, T. A., Leggett, W. C., Moles, M. D., Casselman, J. M., & Schulte-Hostedde, A. I. (2007). Relationships Between Body Condition Indices and Proximate

- Composition in Adult Walleyes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 136(6), 1566–1576. <https://doi.org/10.1577/T06-262.1>
- La Guardia, M. J., Hale, R. C., Harvey, E., & Mainor, T. M. (2001). Alkylphenol Ethoxylate Degradation Products in Land-Applied Sewage Sludge (Biosolids). *Environmental Science & Technology*, 35(24), 4798–4804. <https://doi.org/10.1021/es0109040>
- Leonard, R. J., & Hochuli, D. F. (2017). Exhausting all avenues: Why impacts of air pollution should be part of road ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(8), 443–449. <https://doi.org/10.1002/fee.1521>
- Loria, A., Cristescu, M. E., & Gonzalez, A. (2019). Mixed evidence for adaptation to environmental pollution. *Evolutionary Applications*, 12(7), 1259–1273. <https://doi.org/10.1111/eva.12782>
- Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2020). Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014>
- Miller, P. J., & Loates, M. J. (1996). Hinklased (*Cobitidae*), p.118 In Sillaots, A. and Rauk, H. (ed.), Euroopa kalad., Eesti Entsüklopeediakirjastuse AS, Tallinn.
- Mohammed, A. S., Kapri, A., & Goel, R. (2011). Heavy Metal Pollution: Source, Impact, and Remedies, p. 1-28. In M. S. Khan, A. Zaidi, R. Goel, & J. Musarrat (ed.), *Biomanagement of Metal-Contaminated Soils* Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1914-9_1
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>
- O'Neill, A. J., O'Neill, S., Hegarty, N. J., Coffey, R. N. T., Gibbons, N., Brady, H., Fitzpatrick, J. M., & Watson, R. W. G. (2000). GLUTATHIONE DEPLETION-INDUCED NEUTROPHIL APOPTOSIS IS CASPASE 3 DEPENDENT. *Shock*, 14(6), 605–609. https://journals.lww.com/shockjournal/Abstract/2000/14060/GLUTATHIONE_DEPLETION_IN_DUCED_NEUTROPHIL_APOPTOSIS.6.aspx

- Orr, H. A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature reviews. Genetics*, 10(8), 531–539. <https://doi.org/10.1038/nrg2603>
- Orru, K., Orru, H., Maasikmets, M., Hendrikson, R., & Ainsaar, M. (2016). Well-being and environmental quality: Does pollution affect life satisfaction? *Quality of Life Research*, 25(3), 699–705. JSTOR. <https://www.jstor.org/stable/44852387>
- Oziolor, E., Reid, N., Yair, S., Lee, K., VerPloeg, S., Bruns, P., Shaw, J., Whitehead, A., & Matson, C. (2019). Adaptive introgression enables evolutionary rescue from extreme environmental pollution. *Science*, 364, 455–457. <https://doi.org/10.1126/science.aav4155>
- Pasparakis, C., Esbaugh, A. J., Burggren, W., & Grosell, M. (2019). Physiological impacts of Deepwater Horizon oil on fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 224, 108558. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.06.002>
- Passow, C. N., Arias-Rodriguez, L., & Tobler, M. (2017). Convergent evolution of reduced energy demands in extremophile fish. *PLOS ONE*, 12(10), e0186935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186935>
- Pathiratne, A., & Hemachandra, C. K. (2010). Modulation of ethoxyresorufin O-deethylase and glutathione S-transferase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: Implications in biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology*, 19(6), 1012–1018. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0482-3>
- Pfenninger, M., Lerp, H., Tobler, M., Passow, C., Kelley, J. L., Funke, E., Greshake, B., Erkoc, U. K., Berberich, T., & Plath, M. (2014). Parallel evolution of cox genes in H₂S-tolerant fish as key adaptation to a toxic environment. *Nature Communications*, 5(1), 3873. <https://doi.org/10.1038/ncomms4873>
- Reid, N. M., Proestou, D. A., Clark, B. W., Warren, W. C., Colbourne, J. K., Shaw, J. R., Karchner, S. I., Hahn, M. E., Nacci, D., Oleksiak, M. F., Crawford, D. L., & Whitehead, A. (2016). The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *SCIENCE*, 354(6317), 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/science.aah4993>
- Rossi, A. S., Fantón, N., Michlig, M. P., Repetti, M. R., & Cazenave, J. (2020). Fish inhabiting rice fields: Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxic effects after pesticides application. *Ecological Indicators*, 113, 106186. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106186>

- Siddiqi, M. A., Laessig, R. H., & Reed, K. D. (2003). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants-Old Diseases. *Clinical Medicine and Research*, 1(4), 281–290. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1069057/>
- Snyder, S. M., Olin, J. A., Pulster, E. L., & Murawski, S. A. (2020). Spatial contrasts in hepatic and biliary PAHs in Tilefish (*Lopholatilus chamaeleonticeps*) throughout the Gulf of Mexico, with comparison to the Northwest Atlantic. *Environmental Pollution*, 258, 113775. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113775>
- Sukhovskaya, I. V., Borvinskaya, E. V., Smirnov, L. P., & Kochneva, A. A. (2017). Role of glutathione in functioning of the system of antioxidant protection in fish (review). *Inland Water Biology*, 10(1), 97–102. <https://doi.org/10.1134/S1995082917010187>
- Zeitoun, M. (2014). Impact of Water Pollution with Heavy Metals on Fish Health: Overview and Updates. *Global Veterinaria*, *Global Veterinaria* 12 (2): 219-231, 2014, 219–231. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.02.82219>
- Zhao, L., Yang, F., Milano, S., Han, T., Walliser, E. O., & Schöne, B. R. (2018). Transgenerational acclimation to seawater acidification in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: Preferential uptake of metabolic carbon. *Science of The Total Environment*, 627, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.225>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS*, 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Tuvikene A, Huuskonen S, Koponen K, Ritola O, Mauer U, & Lindström-Seppä P. (1999). Oil shale processing as a source of aquatic pollution: Monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environmental Health Perspectives*, 107(9), 745–752. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107745>
- Uwizeyimana, H., Wang, M., Chen, W., & Khan, K. (2017). The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 55, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.001>
- Vergani, L., Grattarola, M., Borghi, C., Dondero, F., & Viarengo, A. (2005). Fish and molluscan metallothioneins. *The FEBS Journal*, 272(23), 6014–6023. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04993.x>

Wright, L., Zhang, L., Cheng, I., Aherne, J., & Wentworth, G. (2018). Impacts and Effects Indicators of Atmospheric Deposition of Major Pollutants to Various Ecosystems—A Review. *Aerosol and Air Quality Research*, 18. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2018.03.0107>

Yu, L., Han, Z., & Liu, C. (2015). A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.010>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://stats.oecd.org/glossary/detail.asp?ID=2075> (Külastatud 09.03.2020)

<https://energyandcleanair.org/publications/costs-of-air-pollution-from-fossil-fuels/>

(Külastatud 09.03.2020)

<https://www.eea.europa.eu/publications/2599XXX/page008.html> (Külastatud 09.03.2020)

<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f778c998-713e-11e9-9f05-01aa75ed71a1>

(Külastatud 09.03.2020)

<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment> (Külastatud 09.03.2020)

<https://www.envir.ee/et/eesmargid-tegevused/vesi/jaakreostus> (Külastatud 26.05.2020)

https://www.envir.ee/sites/default/files/purtse_lopparuanne_lyhiversioon.pdf

(Külastatud 26.05.2020)

<https://docplayer.ee/151255938-J%C3%A4%C3%A4kreostusobjektide-inventariseerimine-purtse-erra-ja-kohtla-j%C3%B5gede-ning-fenoolisoo-reostusuuringute-aruanne-tallinn-2015.html>

(Külastatud 26.05.2020)

<https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=13&po=9> (Külastatud 04.06.2020)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maiken Abel,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

**Reostunud elupaikadega seotud biokeemilised kaitsemehhanismid elusorganismidel:
kohastumused, plastilised vastused ja nendega seotud lõivsuhted,**

mille juhendajad on PhD Tuul Sepp ja MSc Ciara Baines,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Maiken Abel

07.06.2020

